

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720081152532

UDC _____

厦门大学

_____硕士_____学 位 论 文

五株特殊生境放线菌中安莎类抗生素生物 合成基因簇的克隆及功能分析

Cloning and Functional Analysis of Ansamycin Biosynthetic Gene Cluster in Five Specific Habitats Actinomycetes

陈媛媛

指导教师姓名: 沈 月 毛 教 授

王 浩 鑫 讲 师

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2011 年 04 月

论文答辩时间: 2011 年 06 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 06 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要.....	I
Abstract	II
英文缩略语	IV
第一章 前言	1
1 特殊生境中放线菌研究进展	1
1.1 海洋放线菌及生物活性物质的研究	2
1.2 植物内生放线菌及生物活性物质的研究	4
1.3 红树林生境放线菌及生物活性物质的研究	6
2 安莎类抗生素简介	7
2.1 安莎类抗生素生理活性简介	7
2.2 安莎类抗生素生物合成途径的研究	9
3 本论文研究的目的与意义、内容	14
第二章 材料与方法	16
1 材料	16
1.1 放线菌菌株	16
1.2 其它菌株	16
1.3 质粒	16
1.4 试剂盒	16
1.5 工具酶	16
1.6 常用培养基	17
1.7 主要溶液	17
1.8 主要仪器	19
1.9 引物	19
1.10 分析软件	20
2 实验方法	21
2.1 技术路线	21
2.2 AHBA 合酶基因阳性菌株的筛选	21
2.3 基因组 Fosmid 文库的构建	23
2.4 基因组 Fosmid 文库的评价	26
2.5 基因组 Fosmid 文库的筛选	28
2.6 安莎生物合成基因簇的克隆	31
2.7 安莎类抗生素生物合成中关键基因的表达检测	33
第三章 结果与分析	36
1 AHBA 合酶基因阳性菌株的筛选	36
1.1 AHBA 合酶基因阳性菌株的 PCR 筛选结果	36
1.2 AHBA 合酶基因的系统发育分析	37

2 AHBA 合酶基因阳性菌株 Fosmid 基因组文库的构建	38
2.1 基因组 DNA 的提取	38
2.2 末端修复与回收	39
2.3 连接、包装与感染	39
2.4 克隆的挑取与保存	40
3 基因组 Fosmid 文库的评价	40
4 基因组 Fosmid 文库的安莎生物合成基因簇筛选	41
4.1 文库 fosmids 的阵列保存	41
4.2 AHBA 合酶基因的筛选	42
4.3 AHBA 合酶基因阳性单克隆的酶谱分析	46
4.4 第一轮步移筛选	48
4.5 第二轮步移筛选	48
5 安莎生物合成基因簇的生物信息学分析	50
5.1 全序列开放阅读框分析	50
5.2 与聚酮骨架合成有关的基因分析	57
5.3 与起始单元 AHBA 合成有关的基因分析	60
5.4 基因簇中的调控基因、抗性基因与后修饰基因	62
6 安莎类抗生素生物合成关键基因的表达检测	63
6.1 Streptomyces sp. CS 中 AHBA 合酶基因的表达	63
6.2 AHBA synthase 抗体制备	64
第四章 讨论与结论	68
1 讨论	68
1.1 安莎类抗生素潜在产生菌的 PCR 筛选	68
1.2 潜在安莎产生放线菌的基因组文库的构建	68
1.3 安莎类抗生素生物合成基因簇的克隆	68
1.4 安莎类抗生素生物合成的关键基因表达检测	70
2 结论与展望	70
参考文献	73
附录	79
致谢	102

Contents

Chinese abstract.....	I
English abstract.....	II
Abbreviation.....	IV
Chapter 1 Introduction	1
1 Advances of studies on actinomycetes from specific habitats	1
1.1 Marine actinomycetes and bioactive natural products.....	2
1.2 Plant endophytic actinomycetes and bioactive natural products	4
1.3 Mangrove actinomycetes and bioactive natural products.....	6
2 Introduction to ansamycins.....	7
2.1 Introduction to biological activities of ansamycins	7
2.2 Studies on the biosynthetic pathways of ansamycins	9
3 Purpose and significance of this dissertation	14
Chapter 2 Materials and Methods	16
1 Materials	16
1.1 Actinomycete strains.....	16
1.2 Miscellaneous strains.....	16
1.3 Plasmids	16
1.4 Kits.....	16
1.5 Tool enzymes	16
1.6 Media	17
1.7 Buffers.....	17
1.8 Apparatus	19
1.9 Primers	19
1.10 Bioinformatics softwares	20
2 Methods.....	21
2.1 Technical flow chart.....	21
2.2 Screening of AHBA synthase gene positive strains.....	21
2.3 Constructions of fosmid genomic libraries	23
2.4 Evaluations of fosmid genomic libraries	26
2.5 Screening of fosmid genomic libraries	28
2.6 Cloning of ansamycin biosynthetic gene clusters.....	31
2.7 Optimization of fermentation conditions.....	33
Chapter 3 Results and Analysis.....	36
1 Screening of AHBA synthase gene positive strains	36

1.1 PCR screening of AHBA synthase gene positive strains	36
1.2 Phylogenetic analysis of AHBA synthase genes	37
2 Construction of Fosmid genomic library	38
2.1 Extraction of genomic DNA	38
2.2 End-repair and recovery of the insert DNA fragments	39
2.3 Ligation, packaging and titering	39
2.4 Selection and storage of clones	40
3 Evaluations of Fosmid genomic libraries	40
4 Screening of Fosmid genomic libraries	41
4.1 Storage of fosmids	41
4.2 Screening of AHBA synthase genes	42
4.3 Cleavage map of AHBA synthase gene positive fosmid	46
4.4 The first round walking screening	48
4.5 The second round walking screening	48
5 Bioinformatics analysis of the ansamycin biosynthetic gene clusters	50
5.1 Analysis of ORFs	50
5.2 Analysis of genes encoding Polyketide Synthases	57
5.3 Analysis of genes related to AHBA synthetic pathways	60
5.4 Analysis of genes related to regulation and post-PKS modification	62
6 Detection of critical genes in ansamycins synthetic pathways	63
6.1 Expression of the AHBA synthase gene in <i>Streptomyces</i> sp.CS	63
6.2 Preparation of polyclonal antibody against AHBA synthase	64
Chapter 4 Discussion and Conclusions	68
1 Discussion	68
1.1 PCR screening of potential ansamycins-producing strains	68
1.2 Detection of the expression level of AHBA synthase gene	68
1.3 Constructions of Fosmid genomic libraries	68
1.4 Cloning of ansamycin biosynthetic gene cluster	70
2 Conclusions and perspective	70
Reference	73
Appendix	79
Acknowledgements	102

摘要

随着陆生放线菌资源的深入研究和开发,其常规发酵所产生的次级代谢产物资源几近枯竭,很难为制药业提供足够的药物先导化合物。因此,很多学者将目光投向非土壤环境放线菌,包括极端环境、海洋和植物内共生等放线菌。安莎抗生素(ansamycins)是一类通常具有很强抗细菌、抗真菌、抗癌和抗病毒等作用的I型聚酮类大环内酰胺,主要由放线菌产生。尚待深入研究的海洋放线菌、红树林放线菌和植物内生放线菌都可能蕴藏丰富的安莎类化合物。

本学位论文研究首先通过 PCR 筛选,从 327 株分离自陆地土壤、海滩土样、潮间带泥沙、红树林土样的放线菌以及分离自药用植物的内生放线菌中筛选得到 19 株具有安莎产生潜能的放线菌,即安莎生物合成中特异的 AHBA 合酶基因阳性菌株。然后根据阳性菌株来源的不同和系统发育的差异,选择 *Micromonospora* sp. FXY120、*Streptomyces* sp. LC6、*Streptomyces* sp. XZQH-13、*Streptomyces* sp. XZYN-4 和 *Streptomyces* sp. W112 等 5 株进行 Fosmid 基因组文库的构建;通过以 AHBA 合酶基因为探针的 Southern 杂交和步移筛选,高通量测序从每个基因组文库分别各得到一个安莎合成基因簇;运用生物信息学手段进行了开放阅读框的鉴定、功能推断,序列分析表明从 *Streptomyces* sp. LC6 菌株中获得了一条约 73.8 kb 的安莎合成基因簇,包括聚酮合成酶基因、酰胺合酶基因、AHBA 合成相关基因和部分调节基因及后修饰基因,另外得到 4 个不完整的安莎合成基因簇。最后,对这 5 株 AHBA 合酶基因阳性菌株在 SYP 培养基中进行了小体积发酵,AHBA 合酶的 Western Blot 检测结果显示,除了 *Streptomyces* sp. LC6 菌株外,其余 4 株菌的 AHBA 合酶基因在 SYP 培养基中都有明显表达。

本论文研究结果表明特殊生境放线菌是安莎类抗生素的重要来源,而基于 AHBA 合酶基因序列的 PCR 筛选是寻找潜在安莎产生菌的有效方法,为高效发现新的安莎类药物先导化合物提供了一条新途径。

关键词: 安莎类抗生素; PCR 筛选; AHBA 合酶基因; Fosmid 文库; 序列分析

Abstract

As the terrestrial actinomycetes have been fully investigated and exploited, they can't provide enough new lead compounds for pharmaceutical industry. Thus, many scientists have turned their focus to actinomycetes of non-soil origin, including extreme environment, marine and plant endophytic and associated actinomycetes. Ansamycins is a family of type I polyketide macrolactams, which often possess strong antimicrobial, antifungal, anticancer and/or antiviral activities. Most members of this family were isolated from actinomycetes. It is suggested that ansamycins may be rich in actinomycetes from not fully explored habitats such as marine, mangrove and plant endophytes.

Firstly, this work found 19 potential ansamycin-producing strains by PCR screening of the AHBA synthase gene from 327 Actinomycete strains isolated from beach soil, intertidal sand, mangrove soil and plants. Secondly, we choose five strains *Micromonospora* sp. FXY120, *Streptomyces* sp. LC6, *S.* sp. XZQH-13, *S.* sp. XZYN-4 and *S.* sp. W112 to construct their genomic fosmid libraries, respectively, according to their difference in origins and in the positions of phylogenetic tree constructed on the basis of AHBA synthase genes. We got one ansamycin biosynthetic gene cluster from each of these five libraries, respectively, by Southern hybridization using AHBA synthase gene as a probe walking screening, and sequencing of the positive fosmids with the high-throughput method. Then we identified the ORFs in the sequences and deduced their functions by bioinformatic methods. The results showed that a complete ansamycin biosynthetic gene cluster was cloned from strain LC6, with 73.8 kb length and containing three full type I PKS genes, eight genes involved in the AHBA synthesis, one amide synthase gene and some regulatory and post-PKS modification genes. We also got four partial ansamycin biosynthetic gene clusters from other four strains.

Finally, we fermentated these five strains in small volumes of SYP medium. Western Blot detections showed that four strains except for *S.* sp. LC6 evidently expressed AHBA synthase in SYP medium.

The results of this dissertation showed that actinomycetes of specific habitats are important sources of ansamycins. PCR screening based on AHBA synthase gene is an efficient approach to searching for potential ansamycin-producing strains, which is an effective approach to mining novel ansamycins for drug lead discovery.

Key words: ansamycins; PCR screening; AHBA synthase gene; fosmid library; sequence analysis

英文缩略语

ACP: Acyl Carrier Protein
aDHQ: 5-deoxy-5-amino-3-dehydroquinic acid
aDHS: 5-deoxy-5-amino-3-dehydroshikimic acid
AHBA: 3-amino-5-hydroxybenzoic acid
aminoDAHP: 4-amino-5,6-dihydroxy-2-oxo-7-phosphonoxy-heptanoic acid
Anti-DIG-AP: Anti-digoxigenin-alkaline phosphatase
AT: acyltransferase
ATCC: American Type Culture Collection
BCIP: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
BSA: Bovine serum albumin
CTAB: Cetyltrimethyl Ammonium Bromide
DAHP: 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate
DH: β -hydroxyacyl-thioester dehydratase
DIG Digoxigenin
DTT: Dithiothreitol
EDTA: Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
GDM: Geldanamycin
IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
KR: β -ketoacyl-ACP reductase
KS: β -ketoacyl-ACP synthase
MIC: Minimal Inhibitory Concentration
NBT: Nitro blue tetrazolium
NJ: Neighbor Joining
NRPS: nonribosomal peptide synthetase
OD: Optical Density
ORF: Open Reading Frame
PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS: Phosphate Buffered Saline
PCR: Polymerase Chain Reaction
PDB: Phage Dilution Buffer
PKS: polyketide synthase
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
SSC: Standard Saline Citrate
Tris: Tris[hydroxymethyl]amino-methane
17-AAG: 17-allylamino-17-desmethoxygeldanamycin
17-DMAG: 17-desmethoxy-17-*N,N*-dimethylaminoethylamino-geldanamycin

第一章 前言

放线菌是原核生物中高G+C含量的革兰氏阳性细菌类群，在自然界中分布很广、其种类繁多、代谢功能各异，不仅在自然界物质能量循环中扮演重要的角色，更能够产生种类繁多的生物活性物质^[1]。放线菌所产生的生物活性代谢产物包括抗生素、有机酸、氨基酸、蛋白质、淀粉酶、脂肪酶和酶制剂等，其中抗生素最引人注目，迄今世界上已发现的抗生素大约有三分之二是由放线菌产生的，其中70%以上由链霉菌产生^[2]。1943年，Waksman从放线菌中发现链霉素，此后科学家陆续从放线菌中发现了四环霉素、保米霉素、维利霉素、康霉素、新霉素、土霉素和红霉素等抗菌活性物质，大大缓解了当时各种感染性疾病的肆虐。抗生素的使用对人类健康和生命的保护功不可没，但是近年来，已发现的抗生素在临床应用中由于病原菌不断地产生耐药性渐渐失去原有的高疗效，亟待开发大量新型的生物活性物质以弥补药物空缺。

1 特殊生境中放线菌研究进展

Waksman发现链霉素以后，开启对放线菌的广泛研究，生物活性物质的重要来源土壤放线菌已被开发殆尽，从中寻找新种属或特殊性状的放线菌用于开发新型天然活性物质的难度越来越大。但是从现代分子生物学的研究结果看，自然界实际存在的未知放线菌至少还有90%。目前很多学者将目光投向了新资源放线菌的研究，这些新资源包括海洋和植物内共生等特殊生境。已有的研究表明这些放线菌具有相对特殊的代谢途径，能够产生结构新颖、活性突出及作用机制独特的次级代谢产物，这些新资源成为天然产物研发的新热点。

特殊生境 (specific habitats) 即特殊生态环境的简称，是指那些在结构与功能上具有明显的特殊性，并导致生态元的数量或品质明显不同的生态环境。分离自特殊生境的微生物绝大多数都具有耐冷、耐压、耐盐、耐酸和耐碱等特性，另外还有耐高压、耐高辐射、耐高毒性环境等。大量研究表明，特殊生境是个潜在的、重要的微生物资源库，也可能是产生新型活性物质和先导化合物 (如酶、抗生素、多糖及脂类等)菌株的潜在种源地。因此，从特殊的生态环境乃至极端环境筛选新的放线菌菌株并开发研究它们的次级代谢产物已经成为微生物药物研究的热点。

1.1 海洋放线菌及生物活性物质的研究

海洋环境作为微生物源药物的重要源泉至少有3个理由，首先海洋面积占地球面积的70%，其深度大多在20000 m以上，地域广阔；其次，海洋环境有着复杂和极端的地质化学及生命起源的生态因素，如高盐、高压、低温、低营养和无光照等特殊生态环境；第三，海洋微生物种类存在多样性和特殊性，丰富的海洋生物多样性也同样反映了广泛的化学多样性和新颖性。因此，海洋是发现和筛选新的放线菌物种和多样性代谢产物的宝贵资源。

1.1.1 海洋放线菌的多样性

海洋放线菌广泛栖息于海底沉积物、动植物体表、体内及海水中^[3]。早期人们很容易从海洋环境中分离出*Micromonospora*, *Rhodococcus*和*Streptomyces* 3个类群，这些放线菌普遍存在于包括沉积物等各种海洋环境，是海洋放线菌的优势类群。随着海洋研究的深入，以及分子生态学方法的广泛使用，海洋放线菌多样性研究取得了巨大的进展，越来越多的海洋放线菌被发现^[4]。目前发现的海洋放线菌主要包括链霉菌属 (*Streptomyces*)，以及小单孢菌属 (*Micromonospora*)、游动放线菌属 (*Actinoplanetes*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)和盐生孢菌属(*Salinispora*)等多个稀有放线菌属。

1991年Jensen等从海泥样品中分离得到一类只能在海水培养基中生长的特殊放线菌MAR-1，这是首次发现依赖盐生长的放线菌^[5]，16S rRNA序列分析表明它们是小单孢菌科的一个新属，命名为*Salinispora*。2005年，Kim等人自海绵*Pseudoceratina clavata*中也分离得到了这个属的菌株^[6]。据报道，该属目前由3个种组成，分别是*Sal. arenicola*、*Sal. tropica*和*Sal. pacifica*。在发现*Salinispora*属之后，Jensen等在研究海洋放线菌的过程中，又发现了*Marinispora* (MAR-2)。*Marinispora*也是依赖海水生长的专性海洋放线菌，是链霉菌科的一个新属。至今，从多种海洋样品中分离得到的海洋放线菌，已囊括了13个海洋放线菌的新类群，这13个类群分别属于放线菌目的6个科。MAR-3、4和8属于链霉菌科 (*Streptomycetaceae*)，MAR-5、6和10属于高温单孢菌科 (*Thermomonosporaceae*)，MAR-7属于诺卡氏菌科 (*Nocardiaceae*)，MAR-9和11属于拟诺卡氏菌科 (*Nocardiopsaceae*)，而MAR-12和13属于假诺卡氏菌科 (*Pseudonocardiaceae*)^[7]。2004年，Bister等自日本海海底泥样中分离得到*Verrucosispora*属的一个新种^[8]。

*Aeromicrobium marinum*是Bruns等在德国Wadden海域表层海水中分离到的放线菌,根据其表型以及系统进化差异确定为新属*Aeromicrobium*^[9]。Stach等在日本海底沉积物中分离到菌株SJS0289/JS1T,被确定为*Williamsia*属的一个新种^[10]。

目前新的海洋放线菌资源正在被快速发现,从2003年到2010年发现并描述了*Salinibacterium*和*Salinispora*等12个海洋放线菌新属。随着人们持续不断的努力以及采样、分离手段的进步,越来越多的海洋稀有放线菌新种新属将得到分离及系统性阐明。

1.1.2 海洋放线菌的生物活性物质的研究

海洋放线菌产生的活性次级代谢产物约占目前已发现海洋微生物活性次级代谢产物的50%^[11],其结构新颖、活性独特和活性产物的多样性仅次于海洋真菌,例如具有抗肿瘤^[12]、抗真菌^[13]、抗疟^[14]、杀虫^[15]和免疫调节^[16]的作用。F. Sponga^[17]等对约40000株分离自全球不同海域的海洋微生物的研究结果表明,产生活性物质的放线菌中,31%属于链霉菌 (*Streptomyces*),69%属于稀有放线菌 (主要是小单胞菌属*Micromonospora*)。

分离自海洋沉积物的放线菌MAR4被鉴定为链霉菌属的一个新种,该组菌株产生一系列新颖的杂合萜类化合物。1992年从菌株CNB-632中分离得到quinone(29)^[18]。到目前为止分离分离到属于MAR-4这个种的链霉菌共13株,这些菌株均能产生杂合萜类化合物,包括napyradiomycin (30)^[19]系列和azamerone (31)等。

Fenical^[20]研究组首次从Bahamas热带海域分离到全新分支类群的小单胞菌科 (*Micromonosporaceae*)海洋放线菌——盐孢菌属 (*Salinispora*),经培养提取分离、鉴定出一系列结构新颖的化合物。这些化合物具有很强的抗菌及抗肿瘤活性。特别是salinosporamide A,它是抗癌活性极强的蛋白酶抑制剂,通过不可逆地结合到蛋白酶体20S核心催化单元上,共价修饰苏氨酸活性位点,抑制泛素-蛋白酶体介导的蛋白质水解过程,导致细胞周期紊乱,引发细胞凋亡,从而抑制肿瘤细胞的生长。目前该化合物处于临床 I 期研究阶段。

从小单胞菌科 (*Micromonosporaceae*)的其它属如 *Verrucosispora*, *Micromonospora*等也分到丰富的强活性次级代谢产物^[21],如abyssomicins B-D和 diazepinomicin (ECO-4601)等。其中abyssomicin C是一类磺胺类药物前体,对

MRSA (耐甲氧西林金黄色葡萄球菌)有强抑制作用, 其机理是抑制细菌体内PABA的合成从而抑制叶酸辅酶的生物合成, 这与磺胺类药物作用机制不同, 是一种新的抑菌作用靶点, 对寻找新型高效抗生素具有积极作用。Diazepinomicin^[22]分离自小单孢菌株, 该化合物表现了较强的抗细菌、抗炎及抗肿瘤活性。Diazepinomicin (ECO-4601)于2006年被Ecopia公司投入临床实验。

1.2 植物内生放线菌及生物活性物质的研究

植物内生菌 (plant endophytes)一词最早由De Bary (1866)在研究植物内寄生的病原真菌时使用。随后的研究表明植物内生菌是植物微生态系统中的组成部分, 在不同健康植物的根、茎、叶及果实中均生活着微生物的正常菌群。它们的代谢活动及产物可促进宿主植物适应外界各种 (生物、非生物)环境压力, 维持生态系平衡。

迄今的研究表明, 植物内生菌可与植物结瘤固氮, 产生生长素促进宿主生长, 产生抗生素增加植物的抗病性, 产生次级代谢活性物质使植物具有抗逆、抗虫和除草等功能。另外一些研究表明药用植物中一些内生菌能产生与宿主植物相同或相似的生理活性成分以及其它特殊的生理活性物质, 为解决药用植物的资源危机提供了新的思路, 已经成为新的抗菌抗癌、抗植物病虫害物质的资源宝库。

1.2.1 植物内生放线菌的多样性

内生菌普遍存在于研究过的各种陆生及水生植物中, 已经从数百种植物中发现了植物内生菌。关于植物内生放线菌的报道近年来也陆续增多, 弗兰克氏菌 (Frankia)是最早发现的植物内生放线菌, 它能在非豆科植物根部形成根瘤并具有固氮能力。弗兰克氏菌的寄主广泛, 可以与8科24属共200多种非豆科植物共生, 形成放线菌根瘤 (actinorrhizas)。另外, 在杨梅、沙棘和桉木等木本双子叶植物中也发现了放线菌根瘤。

Coombs等^[23]从小麦根部分离到58株放线菌, 其中包括51株*Streptomyces*、4株*Micromonosporas*、1株*Nocarioides*和1株*Streptosporangium*。从卫茅科和茄科等植物分到*Nocardiopsis*、*Actinomadura*、*Rhodococcus*、*Luteococcus*和*Microlunartus*等属放线菌。

近年来, 从植物中发现了大量的其他内生放线菌, 绝大多数属于链霉菌属 (*Streptomyces*), 此外还有链轮丝菌属 (*Streptoverticillium*)、诺卡氏菌属

(*Nocardia*)、小双孢菌属 (*Microbispora*)、北里孢菌属 (*Kitasatospora*)、动孢囊菌属 (*Kineosporia*)、草孢菌属 (*Herbidospora*)和动多孢菌属 (*Planpolyspora*)等^[24]。从一些植物中还分离到拟无枝菌酸菌属 (*Amycolatopsis*)、假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)、糖霉菌属 (*Glycomyces*)、马杜拉菌属 (*Actinomadura*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、黄球菌属 (*Luteococcus*)、小月菌属 (*Microlunatus*)、两面神菌属 (*Janibacter*)、迪茨氏菌属 (*Dietzia*)、原小单孢菌属 (*Promicromonospora*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、短小杆菌属 (*Curtobacterium*)、野村菌属 (*Nonomuria*)和分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)等。

1.2.2 植物内生放线菌生物活性物质研究

植物内生放线菌具有保护其宿主免受病原菌侵害的能力。这些放线菌通过释放铁离子载体、抗生素或者水解酶实现其保护功能^[25]。由于内生放线菌的特殊生境,使得它们具有某些与土壤中放线菌不同的代谢方式和功能,可能产生一些重要的化合物,具有新的化学结构和生物活性。所以植物内生放线菌将是产生生物活性物质的重要来源^[26]。

已经发现内生放线菌能产生抗菌、抗病毒、免疫抑制剂、降糖、抗肿瘤等重要的生物活性物质。从欧洲桉木根瘤中分离的一株链霉菌能产生一种新萘酮类抗生素,对革兰氏阳性菌有活性,对革兰氏阴性菌则无活性,对K562人白血病细胞有细胞毒性^[27]。

2000年,Strobel研究小组在澳大利亚北部的药用植物蛇藤 (*Kennedia-nigriscans*)中分离到一株链霉菌*Streptomyces* sp. NRRL230562,研究发现:该菌株能产生四种新广谱抗生素Munumbicins A、B、C和D,这些抗生素广泛抑杀多种人体和植物致病霉菌、细菌及疟原虫。最近又从其中分离得到Munumbicins E-4和E-5^[28]。不久后,Strobel等从一种有叶蕨类植物 (*Grevillea teridifolia*)中分离到一株内生链霉菌*Streptomyces* sp. NRRL230566,该菌株产生一类新型抗菌素kakadumycins, kakadumycins含丙氨酸、丝氨酸和一个未知的氨基酸,具有广谱的抑菌活性,对炭疽芽孢杆菌具有抑杀活性,其生物活性比棘霉素高^[29]。

1972年, S. M. Kupchan等通过活性追踪从埃塞俄比亚灌木卫矛科 (*Celastraceae*)植物*Maytenus serrata*中分离得到了具有极强细胞毒活性的化合物

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库